

朱砂叶螨 HSP90 基因克隆及原核表达

冯宏祖^{1,2}, 刘映红^{1,*}, 何林¹, 李明¹, 卢文才¹, 薛传华¹

(1. 西南大学植物保护学院, 重庆市昆虫学及害虫控制工程重点实验室, 重庆 400716;

2. 塔里木大学植物科学学院, 新疆阿拉尔 843300)

摘要:采用 RT-PCR 及 RACE 技术克隆朱砂叶螨 *Tetranychus cinnabarinus* 的热激蛋白 90 (HSP90) 基因, 并进行序列分析, 得到一条长 2 595 bp 的 cDNA 序列, 该序列开放阅读框 (open reading frame, ORF) 为 2 169 bp, 编码 722 个氨基酸, 分子量约为 83.45 kDa, 理论等电点为 4.81, 3' 非编码区 (untranslated region, UTR) 为 249 bp, 5'UTR 为 177 bp。通过 Antheprot 分析发现 5 个 HSP90 家族的签名序列及胞质 HSP90 特征序列 MEEVD。同源性分析表明, 朱砂叶螨 HSP90 编码区核苷酸序列和其他已知的 HSP90, 尤其是节肢动物昆虫的 HSP90, 具有很高的相似性。将鉴定正确的原核重组表达质粒 pET43a-*TcHSP90*, 转化大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 (origami) 进行原核表达, 应用 SDS-PAGE 和 Western blotting 技术分离并检测融合蛋白, 结果表明构建的原核表达质粒可以在宿主菌中稳定、正确表达。朱砂叶螨 *TcHSP90* 基因的克隆、原核表达, 为进一步研究 HSP90 的性质和功能的研究提供有用的实验材料。

关键词: 朱砂叶螨; 热激蛋白 90; 基因克隆; 序列同源性分析; 原核表达

中图分类号: Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2009)00-0845-07

Molecular cloning and prokaryotic expression of heat shock protein 90 (Hsp90) gene in *Tetranychus cinnabarinus* (Acari: Tetranychidae)

FENG Hong-Zu^{1,2}, LIU Yin-Hong^{1,*}, HE Lin¹, LI Ming¹, LU Wen-Cai¹, XUE Chuan-Hua¹ (1. Chongqing Key Laboratory of Entomology & Insect Control Engineering, College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400716, China; 2. College of Plant Science and Technology, Tarim University, Alar, Xinjiang 843300, China)

Abstract: HSP90 gene of *Tetranychus cinnabarinus* was cloned and sequenced by the combination of reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and rapid amplification of cDNA ends (RACE) approaches. A cDNA fragment of 2 595 bp was obtained, including an open reading frame (ORF) of 2 169 bp which encodes a polypeptide of 722 amino acids with a predicted molecular weight of 83.45 kDa and a theoretical isoelectric point of 4.81, 3' untranslated region (UTR) of 249 bp, and a 5'UTR of 177 bp. By using Antheprot analysis, five signature sequences of HSP90 family and C-terminal five amino acids of Hsp90 (MEEVD) were detected. Blast analysis indicated that the nucleotide sequence of HSP90 gene coding region of *Tetranychus cinnabarinus* shared high similarity with other known HSP90s, especially with those from insects of arthropods. The confirmed prokaryotic recombinant expression plasmids pET43a-*TcHSP90* was transformed into *Escherichia coli* BL21 and expressed in prokaryotic cells. The fusion proteins of recombinant *TcHSP90* in *E. coli* BL21 (origami) were separated and identified by SDS-PAGE and Western blotting, and the result showed that the constructed prokaryotic expression plasmid could stably and correctly express in the host bacteria. Cloning and prokaryotic expression of *TcHSP90* from *T. cinnabarinus* would provide useful experimental material for the further study of the nature and function of HSP90.

Key words: *Tetranychus cinnabarinus*; heat shock protein 90; gene cloning; sequence homology analysis; prokaryotic expression

生物体在高温及其他不良环境因子胁迫下, 可诱导合成新的蛋白质, 即热激蛋白 (heat shock

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30600059)

作者简介: 冯宏祖, 男, 1969 年生, 青海互助人, 博士研究生, 副教授, 主要从事农业昆虫与害虫综合防治方面研究, Tel.: 13436046579; E-mail: fhzfdc@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence, Tel.: 13883388183; E-mail: yhlui@swu.edu.cn

收稿日期 Received: 2008-03-15; 接受日期 Accepted: 2009-04-30

proteins, HSPs) (Tissieres *et al.*, 1974)。HSPs 是一组广泛存在于生物体内高度保守的蛋白质家族 (Park *et al.*, 2005)。Morimoto 等 (1993) 按照分子量大小将 HSPs 分为 4 个家族, 即 HSP90 (83 ~ 95 kDa) 家族、HSP70 (66 ~ 78 kDa) 家族、HSP60 家族及 smHSP (small heat shock protein) 家族, 其中 HSP70 和 HSP90 是最普遍的 HSPs。HSP90 家族的第一个成员是在果蝇中发现的, 其分子量为 83 kDa, 所以又称为 HSP83 家族。HSP90 在正常或胁迫条件下的各种类型细胞质中都有存在, 作为陪伴蛋白与变性蛋白结合, 维持它们的折叠状态 (Yonehara *et al.*, 1996), 还能与蛋白激酶和类固醇激素受体等信号传导蛋白相互作用并形成复合体, 使其具有生物活性。即使是在无胁迫条件下, HSP90 也是真核生物必不可少的 (Borkovich *et al.*, 1989), 对细胞在生理、病理及应激条件下的生存发挥了重要作用。

朱砂叶螨 *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) 是世界性害螨, 世代周期短, 寄主范围广, 喜高温干燥条件, 在高温干燥的年份或季节, 常猖獗危害成灾。由于生产上长期大面积使用化学农药防治, 该螨已对多种农药产生了抗药性。何林等 (2005) 研究发现对阿维菌素产生抗性的朱砂叶螨在高温下具有生殖优势和更好的适应能力; 经高温和阿维菌素胁迫后, 朱砂叶螨耐高温品系和阿维菌素抗性品系体内有一些特异性蛋白质表达, 推测这些 HSPs 表达的变化可能与其耐热性及抗药性有关 (刘开林等, 2007; 冯宏祖等, 2008)。目前, 有关朱砂叶螨热休克蛋白方面的研究还很缺乏。为此, 本实验通过 RT-PCR 和 RACE 技术扩增其 HSP90 基因编码区, 最后拼接而获得全长核苷酸序列, 并在大肠杆菌内对该基因进行了诱导表达, 为深入研究 HSP90 基因在朱砂叶螨伴随抗药性产生而产生的高温适合度机理中的作用打下基础。

1 材料和方法

1.1 虫源

将采自 (2002 年) 重庆市北碚区田间豇豆苗上的朱砂叶螨移接到新鲜盆栽豇豆苗上, 饲养条件: 温度为 $26 \pm 1^\circ\text{C}$, 湿度为 75% ~ 80%, 光照为 14:10 (L:D)。连续饲养 6 年约 120 代左右, 饲养过程中不接触任何药剂, 该种群视为敏感种群, 以该种群为供试虫源。

1.2 RNA 的提取和 cDNA 的合成

取朱砂叶螨雌成螨约 20 mg, 用 TRIzol (Invitrogen 公司) 提取总 RNA, 并用 RNase-Free DNase (Promega, USA) 处理以去除 DNA 的污染, RNA 的完整性用 1.2% 变性琼脂糖电泳检查。取 2 μg 总 RNA 反转录合成 cDNA。

1.3 朱砂叶螨 TcHSP90 基因克隆

通过对已知 HSP90s 保守序列比对, 设计 1 对简并引物 S2: 5'-GTNTTYATHATGGAYAAAYTG-3' 和 A2: 5'-ACRTAYTCRTCDATNGGYTC-3', 扩增朱砂叶螨 TcHSP90 基因片段。PCR 反应体系 25 μL , 94 $^\circ\text{C}$ 变性 20 s, 54 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 1 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖电泳分离检查, 对目的条带用胶回收试剂盒 (TaKaRa) 回收, 连接到 pMD18-T 载体 (TaKaRa) 并转化大肠杆菌感受细胞, 涂于含氨苄青霉素的 LB 平板上, 通过蓝白斑筛选, 挑取 14 个阳性克隆测序 (上海英骏生物技术有限公司), 并进行片段核苷酸序列进行 BLAST 比对。

5' 末端扩增, 以获得的目的片段为基础, 设计特异性引物: 5GSP1: 5'-GCAGCAACTTG TTCCTTA GATTCACC-3' 和 5GSP2: 5'-TGTTCCTAAGAGAGCT CCATTTGACC-3', 用反转录试剂盒 (Clontech 公司产品) 中自带的接头引物 (UPM) 和 5GSP1 进行第一轮 PCR 扩增, 然后用 NUP 和 5GSP2 进行巢式扩增。3' 末端扩增用特异性引物 3GSP: 5'-GAAGTAGCCG AGGATAAGGAAGC-3' 和接头引物 R3: 5'-CTGATC TAGAGGTACCGGATCC-3'。分别在 5' 和 3' 端设计 1 对引物 F4: 5'-TGTTTCATCTCACATTTCACAC-3' 和 R4: 5'-AACTACTTTCTATCCCATCCCTT-3' 对全长基因进行验证。

1.4 目的基因的生物信息学分析

序列同源性比对和相似性搜索用 BLAST 软件进行 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), 序列拼接采用 NCBI 网站的 BLAST2 软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/>), 多序列比对采用 CLUSTAL W 程序 (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>); 蛋白序列分析采用 ANTHEPROT 软件包; 采用 CLUSTALX 和 MEGA 3.0 软件, 以邻位相连法 (Neighbor-joining) 构建进化树; 蛋白空间结构预测采用 Swiss-model 软件, 模型查看用 Swiss-PdbViewer 软件。

1.5 原核表达质粒的构建与鉴定

含基因的 T 载体和原核表达载体 pET-43.1a (+) 分别用 *Bam*H I 和 *Xho* I 进行双酶切; 两种酶

切产物经胶纯化后,应用 T4 连接酶重新连接以获得有基因插入片断的重组质粒,将此重组质粒转化至 DH5 α 感受态宿主菌中,涂布于加氨苄青霉素平板(Amp 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$),37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养,挑单菌培养后提取质粒, BamH I 和 Xho I 酶切、测序鉴定其正确性,并命名重组质粒为 pET43a-*TcHSP90*。

1.6 融合蛋白的诱导表达与鉴定

将鉴定正确的 pET43a-*TcHSP90* 重组质粒转化 *E. coli* BL21 (origami), 涂氨苄青霉素平板(Amp 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养,次日 1:100 接种于 LB 液体培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至 OD₆₀₀ 为 0.5~1.0, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 诱导培养 4 和 12 h 后, 离心收集菌体, 进行 SDS-PAGE 检测。将分离后的蛋白转印 PVDF 膜 2 h, 3% BSA 封闭液 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 1 $\times$ PBS 洗膜, 加入抗 HSP90 小鼠单克隆抗体(碧云天公司)(1:1 000), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, 洗膜, 加入辣根过氧化物酶标记的 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG (1:2 000)(中杉金桥公司), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, 充分洗涤后用 DAB(中杉金桥公司)显色鉴定表达产物。

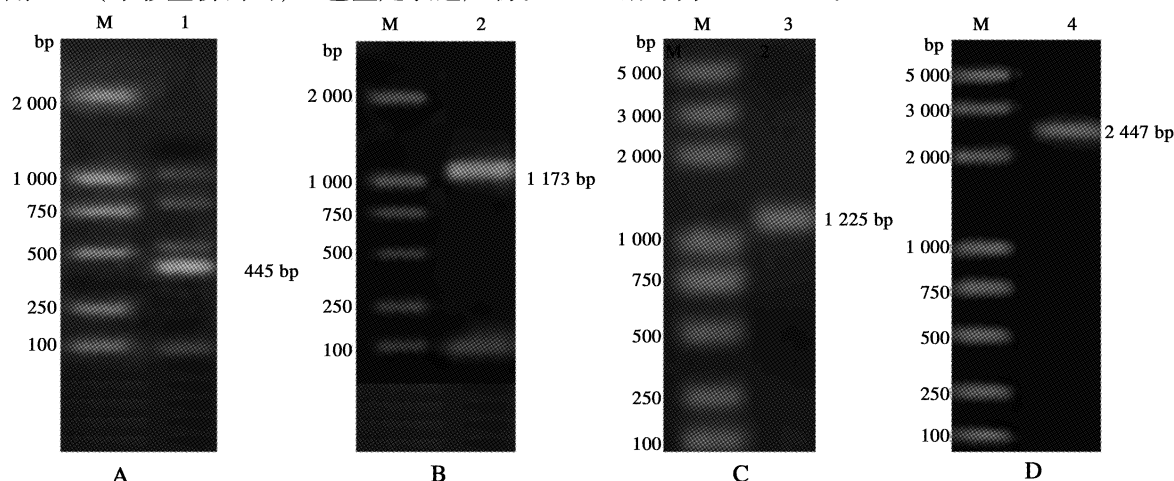


图1 朱砂叶螨 *TcHSP90* 基因 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR products of *TcHSP90* gene in *Tetranychus cinnabarinus*

M: DNA 分子量标准 DNA molecular weight marker; 1: 扩增片段 Amplification of cDNA fragment of *TcHSP90* gene; 2: 3'RACE 片段 Product of 3' RACE amplification; 3: 5'RACE 片段 Product of 5' RACE amplification; 4: 全长基因 The full length cDNA of *TcHSP90* gene.

2.2 朱砂叶螨 *TcHSP90* 基因序列分析

朱砂叶螨 *TcHSP90* 基因的核苷酸及推导的氨基酸序列见图 2。*TcHSP90* 的全长 cDNA 为 2 595 bp, 其中 5'端非编码区(UTR)177 bp, 3'UTR 为 249 bp, 包括一个多聚腺苷酸信号序列(ATTTAA)和 poly A 尾巴, 开放阅读框(ORF)2 169 bp, 编码含 722 个氨基酸的多肽, 预测分子量 83.45 kDa 及理论等电点为 4.81。采用空间结构预测软件 Swiss-model 及模型查看软件 Swiss-

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的提取和 RT-PCR 及 RACE

用 Trizol 试剂提取总 RNA, 反转录合成 cDNA, 以简并引物 S2 和 A2 扩增朱砂叶螨 *TcHSP90* 基因中间片段, 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 结果如图 1(A)。经 BLAST 比对分析该核苷酸序列与其他物种的 HSP90 序列有高度同源性。以 3GSP 和 R3 为 3'RACE 引物扩增朱砂叶螨 *TcHSP90* 基因 cDNA 3' 片段, 结果如图 1(B)。以 5GSP1、5GSP2 和接头引物 UPM、NUPP 为 5'RACE 引物巢式扩增朱砂叶螨 *TcHSP90* 基因 cDNA 5' 片段, 结果如图 1(C); 最后以 F4 和 R4 扩增朱砂叶螨 *TcHSP90* 基因 cDNA 完整阅读框, 结果如图 1(D)。由图 1 可知, 扩增片段大小分别约为 445, 1 173, 1 225 和 2 447 bp, 与预期扩增片段大小相近。完整的 *TcHSP90* cDNA 核苷酸序列为 2 595 bp。将获得的朱砂叶螨 *TcHSP90* 全长基因用 NCBI 网站的 BankIt 进行序列注册, 注册号为 EU851046。

PdbViewer 对获得的朱砂叶螨 *TcHSP90* 的空间结构进行了预测, 结果如图 3。

2.3 *TcHSP90* 基因同源性分析

朱砂叶螨 *TcHSP90* 基因编码的氨基酸序列分析后显示, *TcHSP90* 与脊椎动物和无脊椎动物的 HSP90 具有很高的同源性: 鳞翅目 80.35%, 双翅目 78.83%, 同翅目 78.8%, 脊椎动物 77.8%。多序列比对结果显示, HSP90 家族基因高度保守, 尤其是 5 个其家族签名序列(NKEIFLRELISN[S/A])

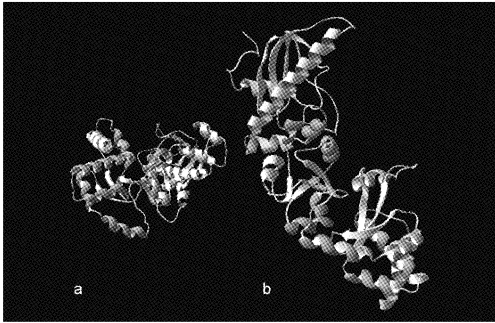


图3 朱砂叶螨 TcHSP90 空间结构预测结果

Fig. 3 Prediction of spatial structure of TcHSP90 protein

a: N 端结构域 N terminal domain; b: C 端结构域 C terminal domain.

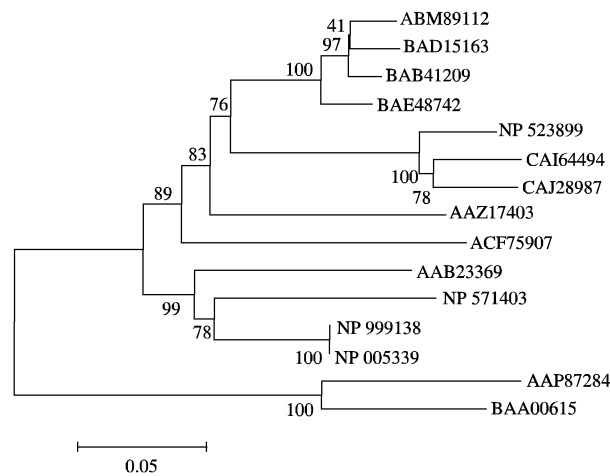


图4 采用邻位法构建的 HSP90 家族系统发育树

Fig. 4 A phylogenetic tree of HSP90 family members constructed with the neighbour-joining method

GenBank 注册号及生物种名如下 The GenBank accession numbers and species names were as follows; BAD15163: 天蚕 *Antheraea yamamai*; BAA00615: 拟南芥 *Arabidopsis thaliana*; AAZ17403: 烟粉虱 *Bemisia tabaci*; BAB41209: 家蚕 *Bombyx mori*; CAJ28987: 地中海实蝇 *Ceratitis capitata*; NP_571403: 斑马鱼 *Danio rerio*; CAI64494: 葱地种蝇 *Delia antiqua*; ABM89112: 落叶松毛虫 *Dendrolimus superans*; NP_523899: 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*; NP_005339: 人 *Homo sapiens*; AAP87284: 大麦 *Hordeum vulgare*; BAE48742: 小菜蛾 *Plutella xylostella*; AAB23369: 家鼠 *Rattus* sp.; NP_999138: 家猪 *Sus scrofa*; ACF75907: 朱砂叶螨 *Tetranychus cinnabarinus*.

2.5 重组蛋白的免疫印迹分析

用 10% 的凝胶进行 SDS-PAGE、考马斯亮蓝染色(图 6)。经 IPTG 诱导后,含 pET43-*TcHSP90* 的菌株表达出大小约 111.12 kDa 的特异性蛋白条带,与理论大小相符。表达产物经 SDS-PAGE 胶分离,再经转膜、封闭、一抗孵育、二抗孵育、显色后,Western blotting 结果表明在 111.12 kDa 处有一条明显的杂交带出现(图 7),与目标蛋白分子量大小完全吻合,表明重组质粒可以在重组菌中稳定表达。

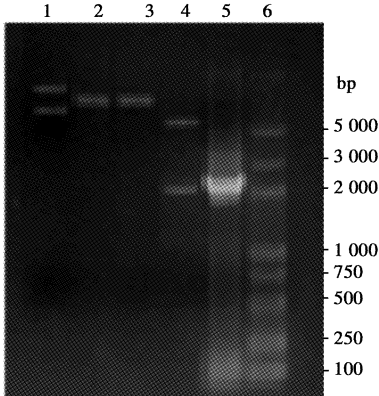


图5 重组质粒 pET43a-*TcHSP90* 酶切和 PCR 鉴定结果

Fig. 5 Restriction map of the recombinant plasmid

pET43a-*TcHSP90* and PCR identification

1: pET43a-*TcHSP90* 质粒 Plasmid pET43a-*TcHSP90*; 2: *Bam*H I 消化 pET43a-*TcHSP90* 的产物 Plasmid pET43a-*TcHSP90* digested by *Bam*H I; 3: *Xho* I 消化 pET43a-*TcHSP90* 的产物 Plasmid pET43a-*TcHSP90* digested by *Xho* I; 4: *Bam*H I、*Xho* I 消化 pET43a-*TcHSP90* 的产物 Plasmid pET43a-*TcHSP90* digested by *Bam*H I and *Xho* I; 5: pET43a-*TcHSP90* 的 PCR 扩增产物 PCR production amplified by pET43a-*TcHSP90*; 6: 5 000 bp DNA 分子量标准 DNA molecular weight marker.

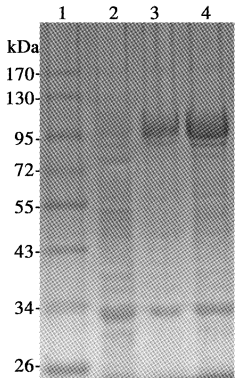


图6 融合蛋白表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of pET43a-*TcHSP90* expression in *Escherichia coli*

1: 蛋白分子量标准 Protein molecular weight marker; 2: pET43a-*TcHSP90* 未经 IPTG 诱导 Expression of pET43a-*TcHSP90* without IPTG induction; 3-4: pET43a-*TcHSP90* 经 IPTG 诱导 Expression of pET43a-*TcHSP90* after induction with IPTG. 下图同 The same for Fig. 7.

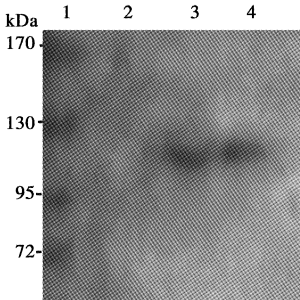


图7 融合蛋白 Western blotting 鉴定结果

Fig. 7 Analysis of purified recombinant protein by Western blotting

3 讨论

本文克隆了朱砂叶螨 *TcHSP90* cDNA 基因全长。并通过保守序列和特征,如 HSP90 家族签名序列、组氨酸激酶样(第 35~188 位)(Gupta, 1995)、典型的 HSP90 结构和功能域,分析了 HSP90 核苷酸序列(Buchner, 1999)。C 端 4 个氨基酸(EEDV)是 HSPs 家族的细胞质定位信号,该肽段能被 HOP (HSP70 and HSP90 organizing protein)的 TPR 结构域所识别(Scheufler *et al.*, 2000),调节并参与多分子伴侣复合物的装配,此外,C-末端具有真核细胞 HSP90 的共同特性 MEEVD 序列。*TcHSP90* 基因编码的氨基酸序列分析后显示,和其他已知的 HSP90 具有很高的相似性,尤其是节肢动物的昆虫。基于上述序列比对,结构比较及系统发育分析推测,*TcHSP90* 属于胞质 HSP90 家族。

构建的原核表达载体 pET43a-*TcHSP90* 诱导表达后经 SDS-PAGE 分离和 Western blotting 证实,能够在大肠杆菌中高效表达出融合蛋白。载体的插入区后面具有 6 个重复的 *cac*,表达出的目的蛋白就带有 His 标签,这样可以通过 His 与固定化金属离子 Ni^{2+} 的亲合力来进行纯化。Origami (DE3)菌株是带有 *trxB* 和 *gor* 双突变的菌株,更有可能促进二硫键的形成,使蛋白可溶性更好,活性更高。朱砂叶螨虫体较小,分离纯化目的蛋白存在一定困难,即使用热激等手段使 HSPs 的含量增加,但由于同一虫体内往往还存在几种 HSPs,因此通过体外表达的方法可以获得大量的纯化蛋白,进行蛋白功能分析,制备抗体,进行后续的检验检测。

HSPs 尤其是 HSP90 和 HSP70 在生物体抵抗高温方面具有重要作用,生物体耐热性获得的速度与 HSPs 积累速率呈正相关;耐热性的下降与 HSPs 的降解同步(Sørensen *et al.*, 2001)。HSPs 家族不仅在热应激的条件下对于细胞有保护作用,在很多外源刺激(环境污染、农药、重金属等)下,都可以诱导生物体内 HSPs 的大量合成与积累,所以 HSPs 已成为一种有潜力的生物指示因子(Biomarker),用于检测对生物造成胁迫的环境因子。HSP70 作为一种环境中不良因素的指标已经得到广泛的认可与应用(Köhler *et al.*, 1998, 2001; Arts *et al.*, 2004; Hallare *et al.*, 2005; Soon *et al.*, 2006)。与 HSP70 相比, HSP90 的研究较少。和其他的 HSPs 不同, HSP90 在非应激的细胞中的含量即可达整个胞质蛋

白的 1%~2%,近年来的研究显示 HSP90 具有广泛的生理功能(Mayer and Bukau, 1999; Fliss *et al.*, 2000; Pearl and Prodromou, 2000)。作者相关的研究结果显示,朱砂叶螨 *TcHSP90* 对外界环境如阿维菌素、高温和低温刺激的响应较为敏感,表明 HSP90 也具备作为生物指示物的潜力,可以和 HSP70 同时使用,更准确地反映环境对生物的影响。

参考文献 (References)

- Arts MJ, Schill RO, Knigge T, Eckwert H, Kammenga JE, Kohler HR, 2004. Stress protein (HSP70, HSP60) induced in isopods and nematodes by field exposure to metals in a gradient near Avonmouth, UK. *Ecotoxicology*, 13: 739–755.
- Borkovich KA, Farrelly F, Finkelstein DB, Taulien J, Lindquist S, 1989. HSP82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures. *Molecular and Cellular Biology*, 9(9): 3 919–3 930.
- Buchner J, 1999. HSP90 & Co.: a holding for folding. *Trends Biochem. Sci.*, 24: 136–141.
- Feng HZ, Liu YH, He L, Yang DX, Li M, Lu WC, 2008. Heat shock response and HSPs of *Tetranychus cinnabarinus* (Acari: Tetranychidae) resistant to avermectin. *Acta Entomologica Sinica*, 51(11): 1 164–1 169. [冯宏祖, 刘映红, 何林, 杨大兴, 李明, 卢文才, 2008. 抗阿维菌素朱砂叶螨的热激反应及热激蛋白. 昆虫学报, 51(11): 1 164–1 169]
- Fliss AE, Benzeno S, Rao J, Caplan AJ, 2000. Control of estrogen receptor ligand binding by HSP90. *The Journal of Steroid Chemistry and Molecular Biology*, 72: 223–230.
- Gupta RS, 1995. Phylogenetic analysis of the 90 kD heat shock family of protein sequences and an examination of the relationship among animals, plants, and fungi species. *Molecular Biology and Evolution*, 12: 1 063–1 073.
- Hallare AV, Schirling M, Luckenbach T, Köhler HR, Triebkorn R, 2005. Combined effects of temperature and cadmium on developmental parameters and biomarker responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Journal of Thermal Biology*, 30(1): 7–17.
- He L, Zhao ZM, Cao XF, Deng XP, Wang JJ, 2005. Effect of temperature on development and fecundity of resistant *Tetranychus cinnabarinus* (Boiduval). *Acta Entomologica Sinica*, 48(2): 203–207. [何林, 赵志模, 曹小芳, 邓新平, 王进军, 2005. 温度对抗性朱砂叶螨发育和繁殖的影响. 昆虫学报, 48(2): 203–207]
- Köhler HR, Bartussek C, Eckwert H, Farian K, Grönzer S, Knigge T, Kunz N, 2001. The hepatic stress protein (HSP70) response to interacting abiotic parameters in fish exposed to various levels of pollution. *J. Aquat. Ecosyst. Stress Recov.*, 8: 261–279.
- Köhler HR, Belitz B, Eckwert H, Adam R, Rahman B, Tronteli P, 1998. Validation of HSP70 stress gene expression as a marker of

- metal effects in *Deroceras reticulatum* (Pulmonata): Correlation with demographic parameters. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17: 2 246 – 2 253.
- Liu KL, He L, Miu YL, Zhang YP, Wang JJ, Zhao ZM, 2007. The impact of high temperature and abamectin to *Tetranychus cinnabarinus* (Boiduval) and expression of heat shock protein. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 23 (1): 249 – 253. [刘开林, 何林, 缪应林, 张云鹏, 王进军, 赵志模, 2007. 高温和阿维菌素对朱砂叶螨的胁迫效应及热休克蛋白研究. 中国农学通报, 23(1): 249 – 253]
- Mayer MP, Bukau B, 1999. Molecular chaperones: the busy life of HSP90. *Curr. Biol.*, 9: 322 – 325.
- Morimoto RI, 1993. Cell in stress: Transcriptional activation of heat shock genes. *Science*, 259: 1 409 – 1 410.
- Park HG, Han SI, Oh SY, 2005. Cellular responses to mild heat stress. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62: 10 – 23.
- Pearl LH, Prodromou C, 2000. Structure and *in vivo* function of HSP90. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 10: 46 – 51.
- Scheufler C, Brinker A, Bourenkov G, Pegoraro S, Moroder L, Bartunik H, 2000. Structure of TPR domain-peptide complexes: Critical elements in the assembly of the HSP70-HSP90 multichaperone machine. *Cell*, 101: 199 – 210.
- Soon ML, Se BL, Chul HP, Jinhee C, 2006. Expression of heat shock protein and hemoglobin genes in *Chironomus tentans* (Diptera, Chironomidae) larvae exposed to various environmental pollutants: a potential biomarker of freshwater monitoring. *Chemosphere*, 65(6): 1 074 – 1 081.
- Sörarensen JG, Dahlgaard J, Loeschke V, 2001. Genetic variation in thermal tolerance among natural populations of *Drosophila buzzatii*: Down regulation of HSP70 expression and variation in heat stress resistance traits. *Functional Ecology*, 15: 289 – 296.
- Tissieres A, Mitchell HK, Tracey UM, 1974. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosome puffs. *Journal of Molecular Biology*, 84: 389 – 398.
- Yonehara M, Minami Y, Kawata Y, Nagai J, Yahara I, 1996. Heat-induced chaperone activity of HSP90. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(5): 2 641 – 2 645.

(责任编辑: 邓艳)